

Е. Е. Тымченко, А. М. Поляничко

## ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ДНК В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ\*

Санкт-Петербургский государственный университет,

Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

В работе исследовали растворы ДНК в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  методами ИК-спектроскопии и тепловой денатурации. Предложен метод анализа ИК-спектров ДНК, основанный на декомпозиции составных полос в области колебаний карбонильных групп. Было показано, что данные ионы способны в разной степени взаимодействовать с химическими группами в составе азотистых оснований ДНК. Было также показано, что для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  это взаимодействие опосредовано молекулами воды. В то же время, ионы  $\text{Cu}^{2+}$  обладают способностью связываться с основаниями напрямую. Установлено существенное влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  на стабильность двойной спирали ДНК. Показано, что это влияние носит различный характер: ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  стабилизируют двойную спираль, тогда как ионы меди  $\text{Cu}^{2+}$  уменьшают её термодинамическую стабильность. Библиогр. 23 назв. Ил. 4. Табл. 1.

*Ключевые слова:* ДНК, ИК-спектроскопия, ионы металлов, кальций, марганец, медь.

**Для цитирования:** Тымченко Е. Е., Поляничко А. М. ИК-спектроскопия водных растворов ДНК в присутствии ионов металлов // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4 (62). Вып. 2. С. 153–162. DOI: 10.21638/11701/spbu04.2017.205

*E. V. Tymchenko, A. M. Polyanychko*

## IR-SPECTROSCOPY OF DNA WATER SOLUTIONS IN THE PRESENCE OF METAL IONS

St. Petersburg State University,

7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

DNA solutions in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions were studied using FTIR-spectroscopy and DNA melting analysis. An approach to the analysis of the IR-spectra of DNA was proposed. The approach is based on decomposition of complex bands in the region of carbonyl vibrations. It was shown that ions can interact with nitrogenous bases. It was also shown that the interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ions occurs via water molecules, while  $\text{Cu}^{2+}$  ions bind the bases directly. The significant influence of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions on the conformational stability of the DNA double helix has been demonstrated. It was shown that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ions stabilize the DNA structure while  $\text{Cu}^{2+}$  ions serve to reduce its thermodynamic stability. Refs 23. Figs 4. Tables 1.

*Keywords:* DNA, FTIR-spectroscopy, metal ions, calcium, manganese, copper.

**For citation:** Tymchenko E. E., Polyanychko A. M. IR-spectroscopy of DNA water solutions in the presence of metal ions. *Vestnik SPbSU. Physics and Chemistry*. 2017, vol. 4 (62), issue 2, pp. 153–162. DOI: 10.21638/11701/spbu04.2017.205

**Введение.** Взаимодействие ионов различных металлов с нуклеиновыми кислотами изучается уже в течение многих лет [1, 2]. Неослабевающий интерес к подобным ис-

---

\* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э. В. Фрисман, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876).

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2017

следованиям вызван тем, что ионы металлов играют важную роль в живых клетках, будучи необходимыми для функционирования многих белков, в том числе ферментов, участвуя в передаче сигналов, являясь элементами сложных регуляторных комплексов хроматина [3–5].

Будучи полианионом, ДНК функционирует в тесном контакте с различными положительно заряженными ионами [6]. Значительная часть свободных ионов металлов в растворе не взаимодействует напрямую с нуклеиновыми кислотами, составляя диффузную ионную атмосферу, обеспечивающую нейтрализацию сильного отрицательного заряда полимерной молекулы [2]. Однако небольшая часть этих ионов способна взаимодействовать напрямую с ДНК, образуя стабильные связи, как с отрицательно заряженными группами сахарофосфатного остова, так и с азотистыми основаниями [2]. Подобные взаимодействия приводят к значительным изменениям вторичной структуры: они могут способствовать изгибу и раскручиванию двойных спиралей, а также служить триггерами В-З перехода в ДНК [2, 7].

Помимо ионов металлов, участвующих во взаимодействии с ДНК, на стабильность образуемых комплексов также влияет содержание азотистых оснований каждого типа. Нуклеотиды ДНК содержат основания четырёх типов (А, Г, Т, Ц). Оба пурина (А, Г) и цитозин Ц содержат азот имидазол- и пиридин-типа, хорошо подходящий для связывания с ионами двухвалентных металлов ( $Me^{2+}$ ). В то же время в тимине (Т) нет подходящих мест связывания, по крайней мере, до тех пор, пока группа NH ( $N3$  тимина) не будет депротонирована. Таким образом, тимин может предоставить лишь карбонильные группы, которые связываются с  $Me^{2+}$  достаточно слабо [8, 9].

На взаимодействие ионов  $Me^{2+}$  в значительной степени влияет относительная мягкость/жесткость ионного потенциала лиганда [7]. Для жестких ионов более вероятными местами связывания с ДНК являются отрицательно заряженные несвязанные атомы кислорода фосфатного остова, а также кислород в составе карбонильных групп оснований. Мягкие же ионы предпочтительно взаимодействуют с азотом в кольце оснований (атомы  $N7$  гуанина,  $N3$  цитозина и  $N7$  и  $N1$  аденина). Однако азот экзоциклических аминогрупп обычно не подходит для связывания ввиду делокализации неподеленной пары электронов в ароматическом кольце. Также на взаимодействие оказывают влияние и пространственные факторы: некоторые функциональные группы оказываются стерически недоступны, находясь внутри двухцепочечной спирали [7].

Несмотря на обилие накопленных к настоящему времени экспериментальных данных, остаются открытыми многие вопросы, связанные с ролью ионов металлов в функционировании сложных надмолекулярных комплексов, формирующихся на ДНК в составе хроматина. Это связано, в значительной степени, с недоступностью столь крупных комплексов для информативного структурного анализа традиционными спектроскопическими методами, такими как круговой дихроизм в видимом и ультрафиолетовом диапазонах. В данной работе изучалось влияние дивалентных ионов металлов  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  на вторичную структуру ДНК в сильно концентрированных растворах методами ИК-спектроскопии.

### Материалы и методы.

**Подготовка препаратов.** В работе использовали ДНК тимуса телёнка (Sigma-Aldrich, США). Водные растворы ДНК обрабатывали ультразвуком, как описано ранее [10–12]. Концентрацию ДНК определяли по величине гиперхромного эффекта после её гидролиза в присутствии 6%-ной хлорной кислоты [13]. Нативность препарата контролировали по величине молярного коэффициента экстинкции  $E(p)$ . В экспериментах использовали растворы солей  $NaCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$  и  $CuCl_2$  (Реахим, Россия). Комплексы

ДНК с ионами металлов готовили путём прямого смешивания равных объёмов растворов ДНК и соответствующей соли, аналогично описанной ранее методике [12, 14–17]. В экспериментах по ИК-спектроскопии все комплексы готовили в виде разбавленных водных растворов. После достижения равновесия в системе, проводили концентрирование проб с одновременным замещением  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9%, «Sigma») путём двукратной сушки при помощи концентратора биомолекул ConcentratorPlus (Eppendorf, Германия) с промежуточным перерастоворением в  $\text{D}_2\text{O}$ . Конечная концентрация ДНК в комплексе составляла 33 мг/мл для ИК-экспериментов и 33 мкг/мл для УФ-экспериментов. Конечное молярное отношение  $R$  ионов металлов в растворе к фосфатным группам ДНК  $[\text{Me}^{2+}]/[\text{P}]$  варьировали в интервале от 0,05 до 10.

**ИК-спектроскопия.** В работе проведён анализ спектров поглощения в ИК-диапазоне в интервале волновых чисел  $1800\text{--}800\text{ см}^{-1}$ , охватывающем области колебаний азотистых оснований ДНК и её сахарофосфатного остова. Спектральное разрешение составляло  $2\text{ см}^{-1}$ . Регистрацию спектров осуществляли при помощи ИК-фурье-спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия), оснащённого низкошумящим МСТ-детектором. Измерения проводили при комнатной температуре в разборных кюветах, изготовленных из  $\text{BaF}_2$ , с длиной оптического пути 50 мкм, задаваемой тефлоновым разделителем. Объём пробы составлял 20 мкл. Все спектры были измерены с использованием  $\text{D}_2\text{O}$  в качестве растворителя. Концентрация ДНК в пробах составляла 33 г/л. Сбор и первичную обработку полученных спектров производили с помощью программного обеспечения OPUS, поставляемого с прибором, с последующей нормировкой спектров на концентрацию ДНК в растворе по величине поглощения на  $896\text{ см}^{-1}$  [11]. После обработки производили декомпозицию спектров методом анализа второй производной (рис. 1), аналогично ранее описанной методике [18, 19].

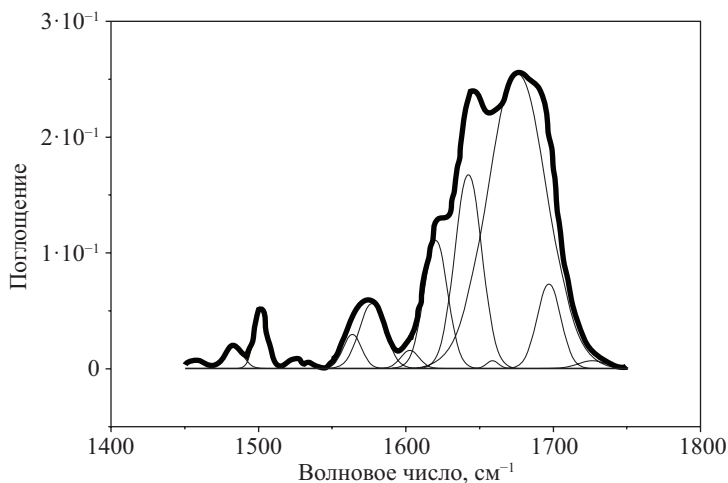


Рис. 1. Пример декомпозиции ИК-спектра ДНК методом анализа второй производной

**Тепловая денатурация ДНК.** Эксперименты по плавлению ДНК проводили путём регистрации спектров УФ-поглощения растворов при их нагреве от  $+20$  до  $+95^\circ\text{C}$ . Спектры УФ-поглощения регистрировали на спектрометре SpecordPlus (AnalytikJena, Германия), оснащённом пельтье-приставкой, позволяющей регулировать температуру кюветы с образцом в интервале  $-5 \div +105^\circ\text{C}$ . Длина оптического пути составляла 1 см. Концентрация ДНК в пробах составила 33 мг/л. Сбор и первичную обработку данных

проводили при помощи программного обеспечения, поставляемого с прибором. УФ-профиль плавления фиксировался в режиме поглощения на длине волны 260 нм с шагом в 1°C и со скоростью нагрева 2°C/мин. Кривые плавления  $D_{260}(T)$  сглаживали по методу Савицкого—Голея. Нормированную кривую плавления  $h(T)$  получали, используя следующее соотношение [20, 21]:

$$h(T) = \frac{D_{260}(T) - D_{260}^{\min}}{D_{260}^{\max} - D_{260}^{\min}},$$

где  $D_{260}^{\max}$  и  $D_{260}^{\min}$  — минимальные и максимальные значения оптической плотности на длине волны 260 нм, соответствующие нативному и денатурированному состояниям ДНК в процессе плавления.

Гипохромный эффект  $G$  определяли по формуле

$$G = \frac{D_{260}^{\max} - D_{260}^{\min}}{D_{260}^{\min}} 100\%.$$

Температуру плавления определяли как точку максимума дифференциальной кривой плавления  $dh(T)/dT$ .

### Результаты и обсуждение.

**ИК-спектроскопия.** *Область колебаний групп в составе оснований ДНК.* Присутствие ионов  $\text{Me}^{2+}$  в растворах ДНК, помимо специфических для каждого иона эффектов, приводит также существенному изменению ионной силы раствора. Для разделения эффектов этих двух факторов на структуру и стабильность ДНК нами была проведена серия контрольных измерений растворов ДНК в условиях, когда соответствующие значения ионной силы достигались за счёт изменения концентрации NaCl. Контрольный эксперимент не показал различия между спектрами образцов с разной концентрацией NaCl в пределах погрешности. Анализ полученных данных позволил выделить ряд особенностей, специфичных для спектров комплексов, содержащих  $\text{Me}^{2+}$ . Ниже они будут рассмотрены подробнее.

Нами были экспериментально получены спектры ИК-поглощения растворов ДНК в присутствии ионов металлов в диапазонах, соответствующих колебаниям групп в составе азотистых оснований (рис. 2) и сахаро-фосфатного остова (рис. 3) [11]. Основные отнесения спектральных полос приведены в таблице. Во всех полученных спектрах ДНК наблюдаются полосы поглощения на 970, 896 и 837  $\text{см}^{-1}$ , характерные для ДНК, находящейся в В-форме [11, 13, 15, 20]. Присутствие ионов  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ведёт к регистрируемым изменениям в спектрах (рис. 2 и 3), которые сведены в таблице.

Наиболее существенные изменения в области колебаний карбонильных групп в составе азотистых оснований наблюдаются для растворов, содержащих  $\text{CuCl}_2$  (рис. 2, кривые 6, 7). Так, с увеличением концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  наблюдается рост полосы на 1678  $\text{см}^{-1}$ , соответствующей суперпозиции колебаний связей  $\text{C6=O}$  гуанина и  $\text{C2=O}$  цитозина, сопровождающийся сдвигом максимума на 1672  $\text{см}^{-1}$  [11, 12]. Поглощение на 1577  $\text{см}^{-1}$ , относящееся к колебаниям  $\text{C=N}$  связи гуанина [11], значительно возрастает и распадается на две полосы на 1580 и 1573  $\text{см}^{-1}$ . Незначительно (в пределах представленных R) увеличивается поглощение на 1502  $\text{см}^{-1}$ , соответствующее связи  $\text{C=N}$  гуанина [11, 12].

Таким образом, описанные изменения могут быть интерпретированы как результат взаимодействия ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с основаниями ДНК [6, 7]. Наиболее выраженные изменения поглощения на 1698, 1678 и 1577  $\text{см}^{-1}$ , а также наличие изменений на 1502  $\text{см}^{-1}$ ,

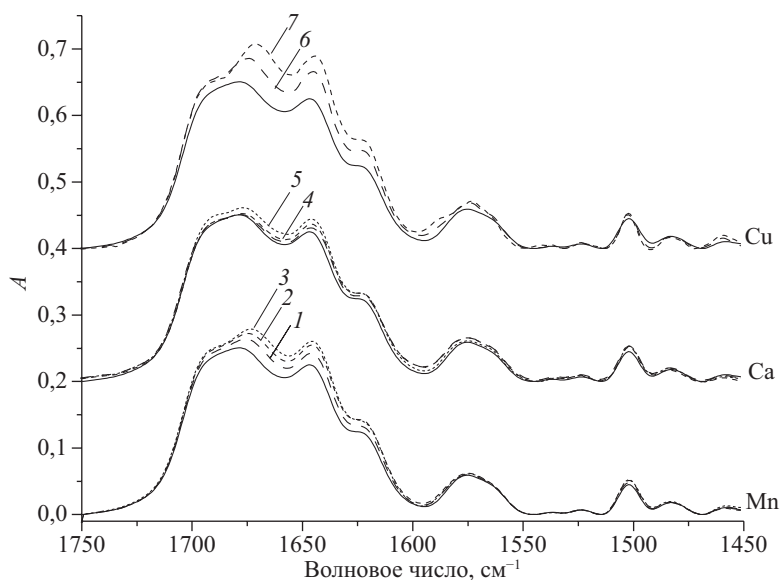


Рис. 2. ИК-спектры ДНК в присутствии ионов металлов:

сплошная линия — ДНК ( $R = 0$ ); ДНК в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  —  $R = 0,5$  (1),  $R = 1$  (2),  $R = 5$  (3);  $Ca^{2+}$  —  $R = 1$  (4),  $R = 10$  (5);  $Cu^{2+}$  —  $R = 0,1$  (6),  $R = 0,5$  (7)

**Результаты декомпозиции ИК-спектров ДНК в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  с отнесением волнового числа к функциональной группе атомов**

Ион										Отнесение	
Ca <sup>2+</sup>					Mn <sup>2+</sup>						
<i>R</i>	ВОЛНОВОЕ число, см <sup>-1</sup>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>S</i> %	<i>R</i>	ВОЛНОВОЕ число, см <sup>-1</sup>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>S</i> %	Группа	Основание
0	1502,0	0,048	0,529	2,4	0	1502,0	0,045	0,515	2,3	C=N	Г
10	1501,8	0,053	0,579	2,5	5	1501,9	0,053	0,611	2,4		
0	1563,3	0,034	0,545	2,5	0	1562,4	0,025	0,358	1,6		
10	1563,3	0,030	0,497	2,1	5	1562,4	0,018	0,255	1,0		
0	1577,7	0,059	1,176	5,4	0	1576,4	0,058	1,229	5,5		
10	1580,2	0,047	0,769	3,3	5	1576,0	0,060	1,464	5,8		
0	1621,4	0,109	2,259	10,3	0	1621,3	0,108	2,256	10,1	кольцо	А Г Ц
10	1620,4	0,111	2,231	9,5	5	1620,7	0,120	2,560	10,2		
0	1643,9	0,169	3,991	18,2	0	1643,9	0,164	3,542	14,1	кольцо	Ц
10	1643,7	0,209	4,771	20,3	5	1642,3	0,169	3,992	17,9	C4=O	Т
0	1659,8	0,010	0,111	0,5	0	1659,8	0,010	0,121	0,5	C4=O	Т
10	1658,9	0,007	0,062	0,3	5	0					
0	1678,1	0,239	11,562	52,9	0	1678,0	0,249	11,685	52,5	C2=O	Ц
10	1675,8	0,255	12,755	54,2	5	1673,0	0,277	13,773	54,9	C6=O	Г
0	1698,1	0,066	1,214	5,6	0	1698,2	0,065	1,202	5,4	C=N	Г
10	1696,7	0,122	2,704	11,5	5	1697,5	0,092	1,852	7,4		

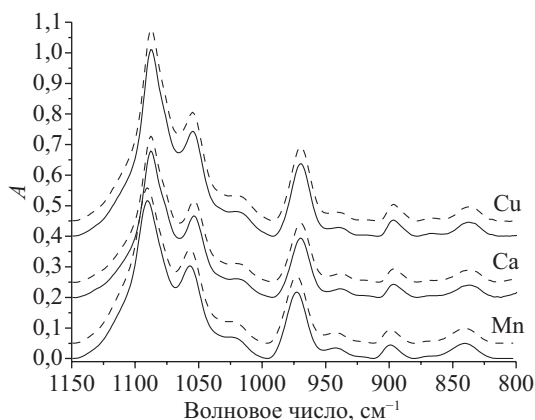


Рис. 3. ИК-спектры ДНК в присутствии ионов металлов:

сплошная линия — ДНК ( $R = 0$ );  
пунктирная линия — ДНК в присутствии ионов:  $\text{Mn}^{2+}$   $R = 5$ ,  $\text{Ca}^{2+}$   $R = 10$ ,  $\text{Cu}^{2+}$   $R = 0,5$

в целом отвечают предпочтительному взаимодействию ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с атомами N7 гуанина и N3 цитозина.

Для серий с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  наблюдаются общие закономерности в изменениях поглощения в области оснований (рис. 2, кривые 1–5). Происходит увеличение и смещение полос на  $1698 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{N}$  гуанина) и  $1678 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}2=\text{O}$ ,  $\text{C}4=\text{O}$ ) в область меньших волновых чисел. Частота колебаний связи  $\text{C}=\text{N}$  гуанина ( $1502 \text{ см}^{-1}$ ) в пределах погрешности не меняется, однако наблюдается рост величины поглощения, соответствующего данному колебанию, при увеличении  $R$ .

Согласно литературным данным [1, 2] ионы  $\text{Ca}^{2+}$  не вступают в непосредственное взаимодействие с основаниями ДНК. Для ионов  $\text{Mn}^{2+}$ , напротив, прямое взаимодействие возможно, но в целом не характерно [11, 17]. Наблюдаемый нами схожий характер относительно небольших изменений в спектрах ИК-поглощения ДНК при увеличении содержания  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в комплексе может свидетельствовать об опосредованном воздействии этих ионов на карбонильные группы оснований. Такое взаимодействие возможно посредством молекул растворителя [11, 12, 24]. Поскольку в присутствии двухвалентных ионов молекулы  $\text{D}_2\text{O}$  будут сильно поляризованы, это может привести к увеличению их влияния на  $\text{C}6=\text{O}$  гуанина и  $\text{C}2=\text{O}$  цитозина, что, возможно, и наблюдается в спектре.

Анализ второй производной показывает наличие скрытого пика на  $1660 \text{ см}^{-1}$  в спектре ДНК ( $R = 0$ ) всех серий, который, вероятно, относится к связи  $\text{C}4=\text{O}$  тимина [24]. Величина соответствующего поглощения значительно уменьшается во всех проанализированных в работе спектрах с увеличением содержания ионов двухвалентных металлов в растворе. Для карбонильной группы тимина известно, что ионы  $\text{Me}^{2+}$  связываются с ней очень слабо. Однако наблюдаемые в спектре изменения весьма выражены и носят монотонный характер. Это также может быть объяснено опосредованным воздействием  $\text{Me}^{2+}$  на  $\text{C}4=\text{O}$  тимина через поляризованные молекулы  $\text{D}_2\text{O}$ . Данный вывод хорошо согласуется с расположением этой группы по большой бороздке ДНК, что делает её доступной для такого взаимодействия.

Во всех сериях с  $\text{Me}^{2+}$  наблюдается увеличение и смещение в область меньших волновых чисел пика на  $1644 \text{ см}^{-1}$ . Этот пик, вероятно, соответствует колебаниям кольца цитозина, либо связи  $\text{C}4=\text{O}$  тимина, либо является суперпозицией их обоих [11, 24]. Смещение этого пика вкупе с уменьшением поглощения на  $1660 \text{ см}^{-1}$  может также свидетельствовать о разрушении водородных связей, образованных  $\text{C}4=\text{O}$  тими-

на и  $\text{NH}_2$ -группой аденина. Данный вывод хорошо согласуется со способностью ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  (при больших концентрациях последнего) дестабилизировать двойную спираль ДНК [11, 25].

Увеличение молярного отношения  $[\text{Me}^{2+}]/[\text{P}]$  во всех сериях ведёт к росту поглощения на  $1621 \text{ см}^{-1}$ . Пик на  $1621 \text{ см}^{-1}$ , относят к колебаниям колец аденина, тимина и цитозина. Увеличение соответствующей полосы может, как и в случае с колебанием на  $1644 \text{ см}^{-1}$  косвенно свидетельствовать о частичном разрушении водородных связей в парах оснований.

*Область колебаний групп в составе сахарофосфатного остова ДНК.* В области  $1150\text{--}800 \text{ см}^{-1}$  (рис. 3) во всех сериях не наблюдается смещения спектральных полос. При этом, однако, нами зарегистрировано изменение поглощения на  $1086 \text{ см}^{-1}$  (наиболее сильное поглощение в ИК-области для ДНК, соответствующее колебаниям  $\text{O}=\text{P}=\text{O}$  связи остова [11, 12]). Для ионов  $\text{Cu}^{2+}$  наблюдается монотонный рост величины поглощения данной полосы с ростом концентрации иона металла. В то же время для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в пределах погрешности эксперимента изменений не наблюдается. Для всех серий также монотонно увеличивается поглощение полосы на  $1053 \text{ см}^{-1}$ , обычно относимое к колебаниям  $\text{C}-\text{O}$  группы сахара [11, 12]. Изменение этих пиков может свидетельствовать о некоторых стабилизационных процессах, происходящих с двойной спиралью ДНК при увеличении  $R$ , аналогичных стабилизации ДНК при увеличении ионной силы раствора.

**Тепловая денатурация ДНК.** Нами было дополнительно проанализировано влияние ионов исследуемых металлов на стабильность ДНК. Для этого была произведена серия экспериментов по тепловой денатурации (плавлению) ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  при  $R = 10$ , а также контрольное измерение в растворе  $\text{NaCl}$  той же ионной силы. Дифференциальные кривые плавления представлены на рис. 4. Согласно полученными нами данным, присутствие в растворе ДНК солей  $\text{MeCl}_2$  ведёт к значительным (по сравнению с аналогичным по ионной силе количеством  $\text{NaCl}$ ) изменениям температуры плавления ДНК. Для растворов ДНК в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдается увеличение температуры плавления на  $\approx 20^\circ\text{C}$ , тогда как присутствие  $\text{Cu}^{2+}$  приводит к понижению температуры плавления ДНК более чем на  $20^\circ\text{C}$ . Существенное уменьшение температуры плавления при добавлении в раствор  $\text{CuCl}_2$  говорит о сильном дестабилизирующем влиянии  $\text{Cu}^{2+}$  на спираль ДНК, что согласуется с данными, полученными ранее другими авторами [23, 25]. Увеличение температуры плавления ДНК при взаимодействии с  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  (см. рис. 4) позволяет заключить, что умеренные концентрации этих ионов оказывают на двойную спираль, в целом, стабилизационный эффект.

**Заключение.** Предложенный в работе метод анализа ИК-спектров ДНК, основанный на декомпозиции составных полос в области колебаний карбонильных групп, позволил провести информативный анализ колебаний, проявляющихся в ИК-спектре ДНК и её комплексов в растворах  $\text{D}_2\text{O}$ . На основе проведённых исследований были

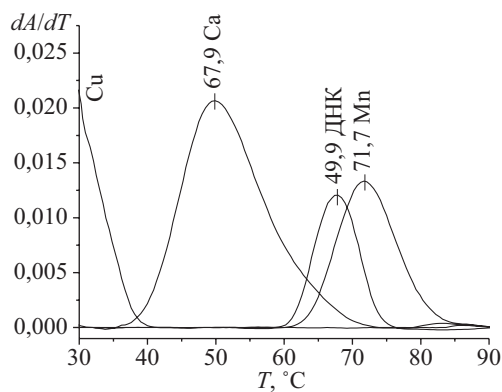


Рис. 4. Кривые плавления ДНК в присутствии ионов металлов



отождествлены взаимодействия ионов металлов с химическими группами в составе ДНК. Было показано, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  обладают существенным дестабилизирующим действием на двойную спираль ДНК, в том числе, за счёт прямого взаимодействия  $\text{Cu}^{2+}$  с основаниями, ведущего к частичному разрыву водородных связей. Было установлено, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  не взаимодействуют непосредственно с группами в составе азотистых оснований. Действие этих ионов осуществляется через молекулы воды. В умеренных концентрациях ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  оказывают на ДНК стабилизирующее действие.

Мы полагаем, что предложенный нами подход может быть с успехом использован при анализе спектров ДНК с другими лигандами, в том числе различными органическими и неорганическими соединениями, а также лекарственными препаратами.

\* \* \*

Часть исследований проведена в Ресурсных центрах «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» Санкт-Петербургского государственного университета.

## Литература

1. Manning G. S. Counterion binding in polyelectrolyte theory // Acc. Chem. Res. 1979. Vol. 12. P. 443–449.
2. Pechlaner M., Sigel R. K. O. Metal ion-nucleic acid interactions in solution // Met. Ions Life Sci. 2012. Vol. 10. P. 1–34.
3. Sen D., Crothers D. M. Influence of DNA-binding drugs on chromatin condensation // Biochemistry. 1986. Vol. 25. P. 1503–1509.
4. Sigel R. K. O., Pyle A. M. Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry // Chem. Rev. 2007. Vol. 107. P. 97–113.
5. Sen D., Crothers D. M. Condensation of chromatin // Biochemistry. 1986. Vol. 25. P. 1495–1503.
6. Misra V. K., Shiman R., Draper D. E. A thermodynamic framework for the magnesium-dependent folding of RNA // Biopolymers. 2003. Vol. 69. P. 118–136.
7. Sigel R. K. O., Sigel H. A. Stability concept for metal ion coordination to single-stranded nucleic acids and affinities of individual sites // Acc. Chem. Res. 2010. Vol. 43. P. 974–984.
8. Erat M. C., Sigel R. K. O. Methods to detect and characterize metal ion binding sites in RNA // Met. Ions Life Sci. 2011. Vol. 9. P. 37–100.
9. Handbook of vibrational spectroscopy / eds J. M. Chalmers, P. R. Griffiths. Wiley, 2001. Vol. 1. 4000 p.
10. Taillander E., Liquier J., Taboury J. A. Infrared spectral studies of DNA conformations // Advances in Infrared and Raman Spectroscopy. 1985. Vol. 12. P. 65–114.
11. Polyanichko A. M., Andrushchenko V. V., Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on DANN structure: electronic and vibrational circular dichroism studies // Nuc. Ac. Res. 2004. Vol. 32, N 3. P. 989–996.
12. Eichhorn G. L., Shin Y. A. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity // J. Am. Chem. Soc. 1968. Vol. 90, N 26. P. 7323–7328.
13. Spirin A. S. Spectrophotometric determination of total nucleic acids // Biochemistry. 2014. Vol. 23. P. 657–662.
14. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on the structure of DNA/HMGB1/H1 complexes: Electronic and vibrational circular dichroism studies // Biopolymers. 2006. Vol. 83. P. 182–192.
15. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Kostyleva E. I., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on DNA compaction in the complex with HMGB1 nonhistone chromosomal protein // Molecular Biology. 2004. Vol. 38. P. 701–712.
16. Chikhirzhina E. V., Polyanichko A. M., Kostyleva E. I., Vorobyev V. I. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions. 1. Circular dichroism spectroscopy // Molecular Biology. 2011. Vol. 45, N 2. P. 318–326.



17. Polyanchko A. M., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions. 2. Vibrational circular dichroism spectroscopy // *Molecular Biology*. 2013. Vol. 47, N 2. P. 300–307.
18. Polyanchko A. M., Romanov N. M., Starkova T. Y., Kostyleva E. I., Chikhirzhina E. V. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra // *Cell and Tissue Biology*. 2014. Vol. 8, N 4. P. 352–358.
19. Polyanchko A. M., Mikhailov N. V., Romanov N. M., Baranova Yu. G., Chikhirzhina E. V. Inter-molecular interactions in the solutions of serum albumin // *Tsitologiya*. 2014. Vol. 58, N 9. P. 707–713.
20. Rodionova T. Y., Chikhirzhina E. V., Vorob'yov V. I., Polyanchko A. M. Changes in the secondary structure of HMGB1 protein bonded to DNA // *J. Struct. Chem.* 2010. Vol. 50. P. 976–981.
21. Polyanchko A. M., Rodionova T. J., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Conformational properties of nuclear protein HMGB1 and specificity of its interaction with DNA // *Cell and Tissue Biology*. 2011. Vol. 5, N 2. P. 114–119.
22. Polyanchko A., Wieser H. The FTIR/VCD spectroscopy as an informative tool for the investigation of large supramolecular complexes of biological macromolecules // *Biopolymers*. 2005. Vol. 78, N 6. P. 329–339.
23. Fritzsche H., Zimmer C. Infrared studies of deoxyribonucleic acids, their constituents and analogues. 4. The binding sites of copper(II) in DNA // *Eur. J. Biochem.* 1968. Vol. 5, N 1. P. 42–44.
24. Taniguchi H., Saito M. The effect of water on infrared spectra of DNA // *J. Phys.: Cond. Matt.* 2009. Vol. 21. 064242.
25. Andrushchenko V., van de Sande J. H., Wieser H. Vibrational circular dichroism and IR absorption of DNA complexes with Cu<sup>2+</sup> ions // *Biopolymers*. 2003. Vol. 72, N 5. P. 374–390.

## References

1. Manning G. S. Counterion binding in polyelectrolyte theory. *Acc. Chem. Res.*, 1979, vol. 12, pp. 443–449.
2. Pechlaner M., Sigel R. K. O. Metal ion-nucleic acid interactions in solution. *Met. Ions Life Sci.*, 2012, vol. 10, pp. 1–34.
3. Sen D., Crothers D. M. Influence of DNA-binding drugs on chromatin condensation. *Biochemistry*, 1986, vol. 25, pp. 1503–1509.
4. Sigel R. K. O., Pyle A. M. Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. *Chem. Rev.*, 2007, vol. 107, pp. 97–113.
5. Sen D., Crothers D. M. Condensation of chromatin. *Biochemistry*, 1986, vol. 25, pp. 1495–1503.
6. Misra V. K., Shiman R., Draper D. E. A thermodynamic framework for the magnesium-dependent folding of RNA. *Biopolymers*, 2003, vol. 69, pp. 118–136.
7. Sigel R. K. O., Sigel H. A. Stability concept for metal ion coordination to single-stranded nucleic acids and affinities of individual sites. *Acc. Chem. Res.*, 2010, vol. 43, pp. 974–984.
8. Erat M. C., Sigel R. K. O. Methods to detect and characterize metal ion binding sites in RNA. *Met. Ions Life Sci.*, 2011, vol. 9, pp. 37–100.
9. *Handbook of vibrational spectroscopy*. Eds J. M. Chalmers, P. R. Griffiths. Wiley, 2001, vol. 1, 4000 p.
10. Taillander E., Liquier J., Taboury J. A. Infrared spectral studies of DNA conformations. *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, 1985, vol. 12, pp. 65–114.
11. Polyanchko A. M., Andrushchenko V. V., Chikhirzhina E. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on DANN structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nuc. Ac. Res.*, 2004, vol. 32, no 3, pp. 989–996.
12. Eichhorn G. L., Shin Y. A. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, vol. 90, no 26, pp. 7323–7328.
13. Spirin A. S. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. *Biochemistry*, 2014, vol. 23, pp. 657–662.
14. Polyanchko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on the structure of DNA/HMGB1/H1 complexes: Electronic and vibrational circular dichroism studies. *Biopolymers*, 2006, vol. 83, pp. 182–192.
15. Polyanchko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Kostyleva E. I., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of Ca<sup>2+</sup> ions on DNA compaction in the complex with HMGB1 nonhistone chromosomal protein. *Molecular Biology*, 2004, vol. 38, pp. 701–712.
16. Chikhirzhina E. V., Polyanchko A. M., Kostyleva E. I., Vorobyev V. I. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions. 1. Circular dichroism spectroscopy. *Molecular Biology*, 2011, vol. 45, no 2, pp. 318–326.

17. Polyanichko A. M., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions. 2. Vibrational circular dichroism spectroscopy. *Molecular Biology*, 2013, vol. 47, no 2, pp. 300–307.
18. Polyanichko A. M., Romanov N. M., Starkova T. Y., Kostyleva E. I., Chikhirzhina E. V. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. *Cell and Tissue Biology*, 2014, vol. 8, no 4, pp. 352–358.
19. Polyanichko A. M., Mikhailov N. V., Romanov N. M., Baranova Yu. G., Chikhirzhina E. V. Inter-molecular interactions in the solutions of serum albumin. *Tsitologiya*, 2014, vol. 58, no 9, pp. 707–713.
20. Rodionova T. Y., Chikhirzhina E. V., Vorob'yov V. I., Polyanichko A. M. Changes in the secondary structure of HMGB1 protein bonded to DNA. *J. Struct. Chem.*, 2010, vol. 50, pp. 976–981.
21. Polyanichko A. M., Rodionova T. J., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Conformational properties of nuclear protein HMGB1 and specificity of its interaction with DNA. *Cell and Tissue Biology*, 2011, vol. 5, no 2, pp. 114–119.
22. Polyanichko A., Wieser H. The FTIR/VCD spectroscopy as an informative tool for the investigation of large supramolecular complexes of biological macromolecules. *Biopolymers*, 2005, vol. 78, no 6, pp. 329–339.
23. Fritzche H., Zimmer C. Infrared studies of deoxyribonucleic acids, their constituents and analogues. 4. The binding sites of copper(II) in DNA. *Eur. J. Biochem.*, 1968, vol. 5, no 1, pp. 42–44.
24. Taniguchi H., Saito M. The effect of water on infrared spectra of DNA. *J. Phys.: Cond. Matt.*, 2009, vol. 21, 064242.
25. Andrushchenko V., van de Sande J. H., Wieser H. Vibrational circular dichroism and IR absorption of DNA complexes with Cu<sup>2+</sup> ions. *Biopolymers*, 2003, vol. 72, no 5, pp. 374–390.

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

#### Контактная информация

Тымченко Екатерина Евгеньевна – студентка; e-mail: e.tymchenko@yandex.ru

Поляничко Александр Михайлович – кандидат физико-математических наук, доцент;  
e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Tymchenko Ekaterina E. – student; e-mail: e.tymchenko@yandex.ru

Polyanichko Alexander M. – PhD, Associate Professor; e-mail: a.polyanichko@spbu.ru